

Università degli studi di Napoli Federico II



Dipartimento di Ingegneria Civile, Edile e Ambientale

Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio

«Rimozione e recupero di metalli preziosi da reflui industriali attraverso processi di biosorbimento con microalghe estremofile. Analisi sperimentale del processo di uptake e delle possibili interazioni EPS-metallo»

Relatore

Ch.mo Prof. Ing. Massimiliano Fabbicino

Correlatori

Prof. Ing. Marco Race

Prof.ssa Claudia Ciniglia

Dott. Ludovico Pontoni

Candidati

Mirko Mennillo Matr.: M67/401

Michele Parmentola Matr.: M67/333

Problematica affrontata



Questo lavoro mira alla rimozione e al recupero di metalli preziosi da reflui industriali attraverso processi di biosorbimento

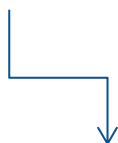
"Lo sviluppo sostenibile è quello che soddisfa le necessità delle attuali generazioni senza compromettere la capacità delle future generazioni di soddisfare le proprie"

()Commissione mondiale sull'ambiente e lo sviluppo dell'ONU, (1987)*

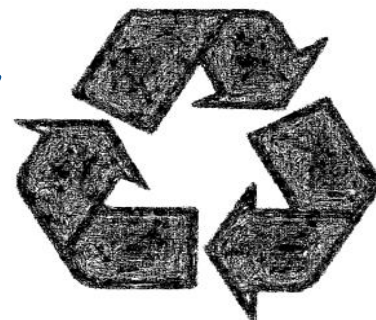
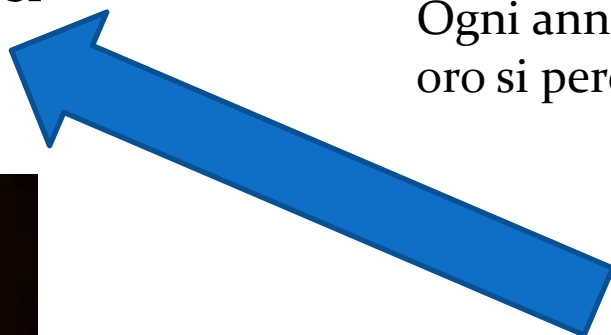
Metalli preziosi nelle fognie



Recupero metalli preziosi



Ogni anno circa 43 chilogrammi di oro si perdono nelle fognature.*



(*) *Enviromental Science & Technology*

I metalli preziosi studiati

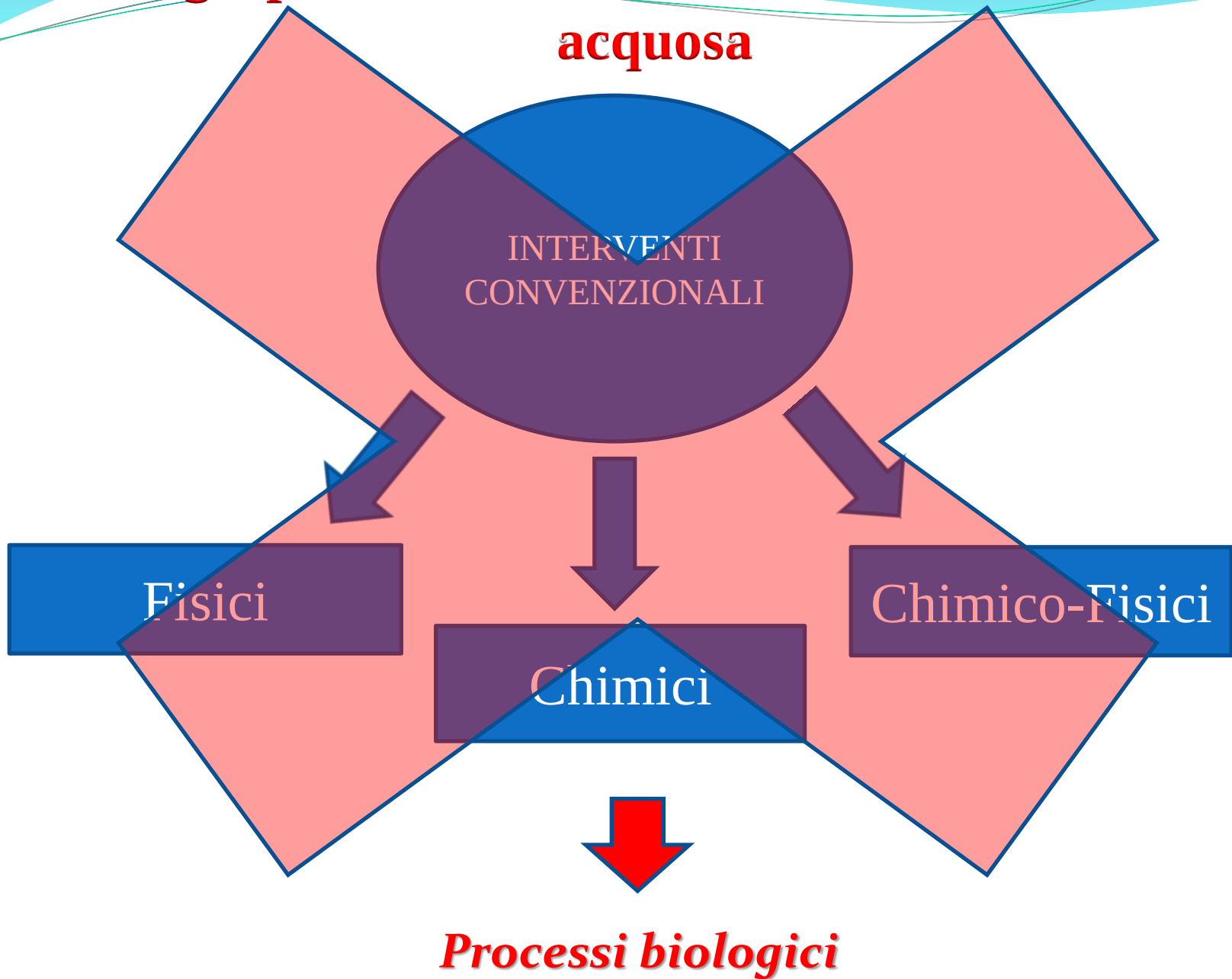
L'**oro** è considerato il metallo prezioso per eccellenza. La sua quotazione attuale si aggira attorno ai **37 euro al grammo**. Esso è impiegato in gioielleria e in vari settori industriali.



Un altro metallo, tra i più rari, è il **palladio**, utilizzato in svariati settori, dalla gioielleria al settore automobilistico. Attualmente il costo stimato è **22 euro al grammo**.



Tecnologie per rimuovere ioni metallici dalla soluzione acquosa



Tecnologie BIO

Biosorbimento



Il biosorbimento può essere definito come la rimozione di metalli o specie metalloidi, composti e particolato dalla soluzione attraverso materiale biologico (Gadd, 1993)

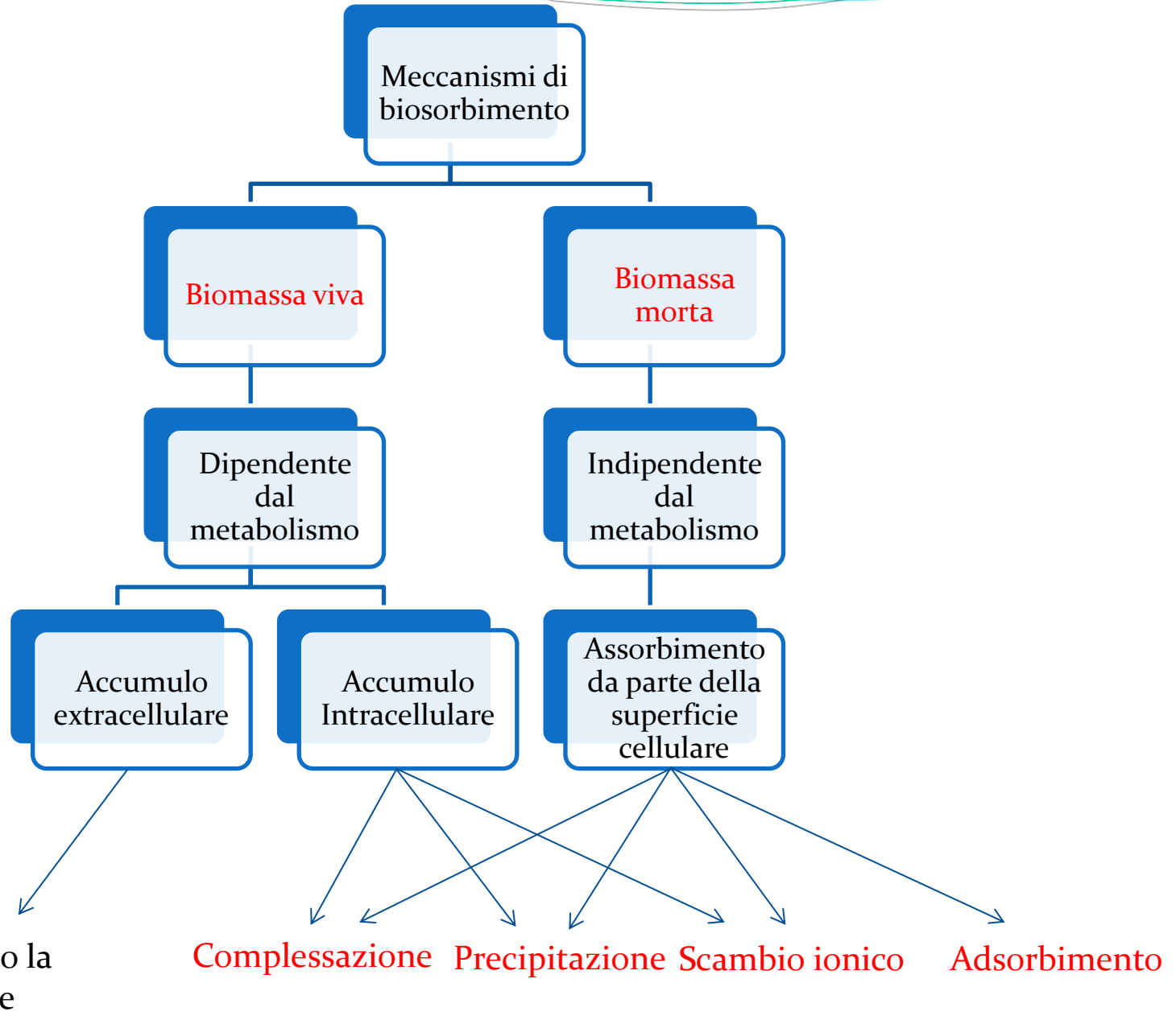
Parametri influenzanti

- ☐ pH;
- ☐ Temperatura;
- ☐ Coesistenza di differenti ioni metallici;
- ☐ Dosaggio biomassa;
- ☐ Concentrazione iniziale del soluto;
- ☐ Velocità e tempo di agitazione;
- ☐ Struttura EPS

Perché utilizzare materiale bio?

- ✓ Tecnica economica ed eco-compatibile
- ✓ Grande disponibilità di materiale biologico in natura
- ✓ Tecnica non invasiva
- ✓ Riduzione dei sottoprodotti della depurazione

Meccanismi di biosorbimento



Organismi estremofili

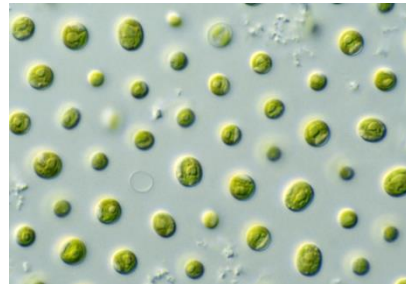
Fattori ambientali	Organismi
Elevate temperature	Termofili
Basse temperature	Psicrofili
Elevata salinità	Alofili
Elevato pH	Alcalofili
Basso pH	Acidofili
Alte pressioni	Barofili
Radiazioni	Radio-tolleranti

- ❑ Un organismo estremofilo sopravvive e prolifera in condizioni fisiche e/o geochimiche estreme (temperatura, pressione, pH), che sono proibitive per i restanti organismi.
- ❑ Batteri ed alghe presentano capacità spiccate di adattamento a condizioni ecofisiologiche estreme.

Alghe estremofile



Microalghe estremofile



Galdieria



Classe:

✓ Cyanidiophyceae

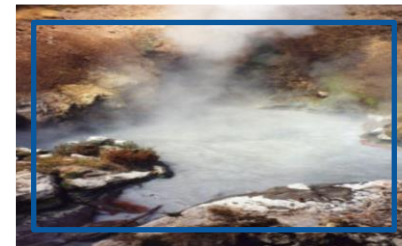
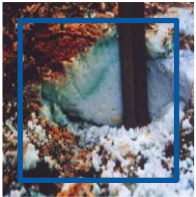
Specie:

✓ Unicellulare



Origine:

✓ Sorgenti
calde ed
ambienti
sulfurei



✓ Crescita
endolitica



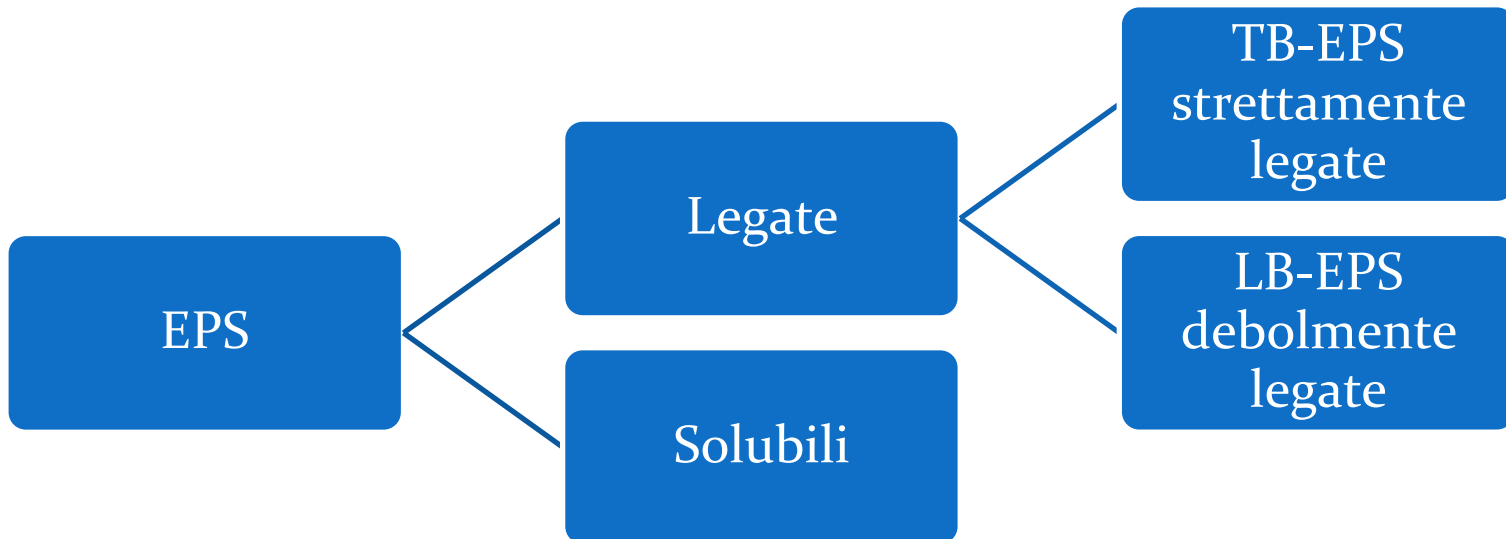
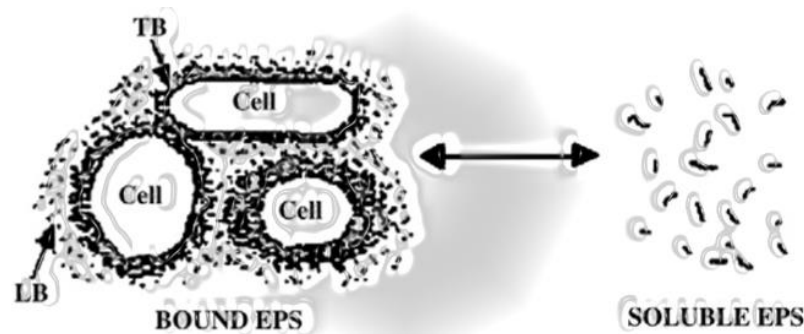
✓ Alta tolleranza di sali e
metalli tossici



✓ pH 0÷4

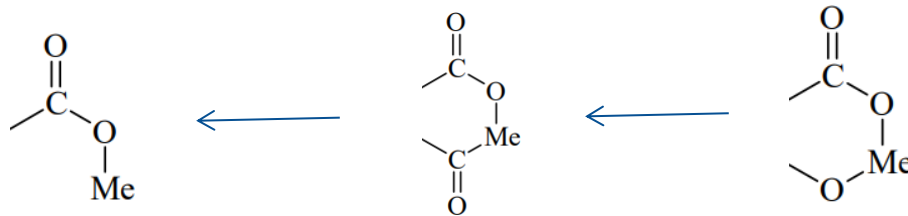
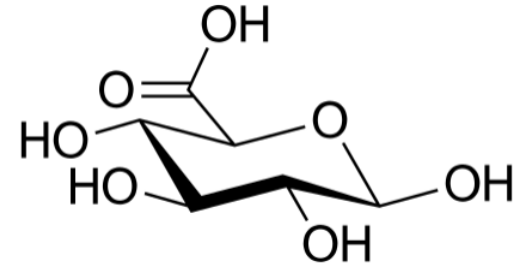
Extracellular Polymeric Substances (EPS)

- ❑ Le sostanze polimeriche extracellulari sono una complessa miscela di polimeri ad alto peso molecolare escreti dai microrganismi.



EPS: elemento centrale nel biorisanamento da metalli

- Le EPS formano complessi con cationi metallici



- Enorme complessità strutturale delle EPS
- Ruolo funzionale di ciascun componente EPS di difficile interpretazione nel biosorbimento di metalli

Obiettivi del lavoro

- ❑ Testare le capacità bioaccumulatrici della micro-alga estremofila Galdieria
- ❑ Valutazione dei meccanismi di uptake per individuare modalità di recupero
- ❑ Caratterizzazione «quantitativa» e «qualitativa» delle sostanze polimeriche extracellulari (EPS) della Galdieria
- ❑ Valutazioni delle possibili interazioni EPS-metalli preziosi

Fasi e metodologie di lavoro

Fase preliminare

- Contaminazione con Au e Pd di 4 diversi ceppi algali appartenenti al genere *Galdieria*.
- Caratterizzazione delle EPS dei 4 ceppi algali.
- Individuazione del ceppo più performante.

Studio 786.2

- Studio della cinetica di uptake per Au e Pd.
- Contaminazione combinata di Au e Pd.
- Cinetica di uptake per Au e Pd con utilizzo di un refluo sintetico.
- Comprensione del meccanismo di uptake.

Studio interazione EPS- metallo

- Caratterizzazione quantitativa delle EPS.
- Caratterizzazione qualitativa delle EPS, per il 786.2 .
- Confronto quantitativo delle EPS, pre e post-contaminazione.

Fase Preliminare

Condizioni di crescita → Mixotrofia

Campionamento → OD = 1,2 – 1,5

Ricetta terreno Allen			
	Composti	Soluzione stock	Terreno Allen (1l)
1	KH_2PO_4	(15g/500ml)	10ml
2	K_2HPO_4	(30g/500ml)	10ml
3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(1g/500ml)	10ml
4	NaCl	(5g/500ml)	10ml
5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	(15g/500ml)	10ml
6	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	(0,5g/500ml)	10ml
7	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	(66g/500ml)	10ml
8	Microelementi	/	10ml

Ricetta microelementi terreno Allen			
	Composti	Soluzione stock	Soluzione stock microelementi (500ml)
1	ZnCl_2	(140mg/100ml)	0,5ml
2	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(50mg/100ml)	0,5ml
3	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	(100mg/100ml)	0,5ml
4	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	(50mg/100ml)	0,5ml
5	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	(41,6mg/200ml)	2,4ml

Galdieria prima e dopo contaminazione da Pd



Contaminazione:

- 1 mg/l, 25 mg/l e 50 mg/l di Au (come KAuCl_4) e Pd (come PdCl_2).

Tempo di contatto:

- 30 min ed a 4 d

Studio 786.2

***Cinetica uptake
Au e Pd***



- 25mg/l e 50mg/l
- Tempi di contatto: 1, 5, 15, 30 minuti

***Contaminazione
combinata di Au e Pd***



- 1 mg/l di Au + 1mg/l di Pd e 50 mg/l di Au + 50 mg/l di Pd.
- Tempo di contatto: 30 min e 1 d

***Cinetica uptake Au
e Pd in refluo
sintetico***



- Au: 1,13mg/l Fe: 24,4mg/l Cu: 1,23mg/l
- Pd: 18,3mg/l Zn: 0,43mg/l Pb: 11,1mg/l
- Cr: 4,4mg/l Ni: 64,2mg/l Al: 16,6mg/l*

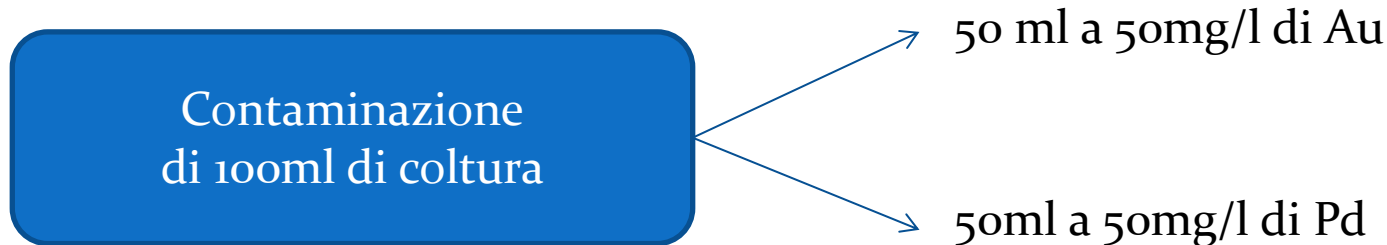
***Cinetica uptake Au e
Pd alle
concentrazioni nel
refluo sintetico***



- Au: 1,13mg/l e Pd:18,3mg/l

Studio 786.2

Valutazione del meccanismo di uptake – speciazione dei metalli



Separato il surnatante, il pellet algale è stato risospeso in 10ml di H₂O.

Sono stati utilizzati tali reagenti:

- (H₂O₂ + HNO₃)*
 - NaClO
 - Acqua regia
- Valutazione della frazione ossidabile e residua del metallo assorbito dall'alga
- C₆H₁₄
- Valutazione della possibile presenza di acidi organici che potrebbero complessare il metallo

(*)A. Tessier et al., (1979)-Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Metals

Studio interazione EPS - metallo

Metodo Frølund* —→ Prevede l'utilizzo di una resina naturale di scambio cationico (CER)

Metodo migliore in termini di :

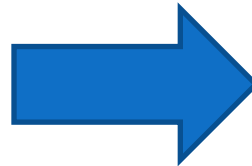
- resa delle EPS estratte
- minimale distruzione degli esopolimeri
- bassa lisi cellulare

$$\frac{g \text{ CER}}{g \text{ biomassa}} = 70$$

Alla fine del metodo si ottiene una soluzione contenente le EPS, macromolecole, sali disciolti e membrane batteriche.

Liofilizzazione

Dialisi



EPS

(*) B. Frølund et al., (1996) - "Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin"

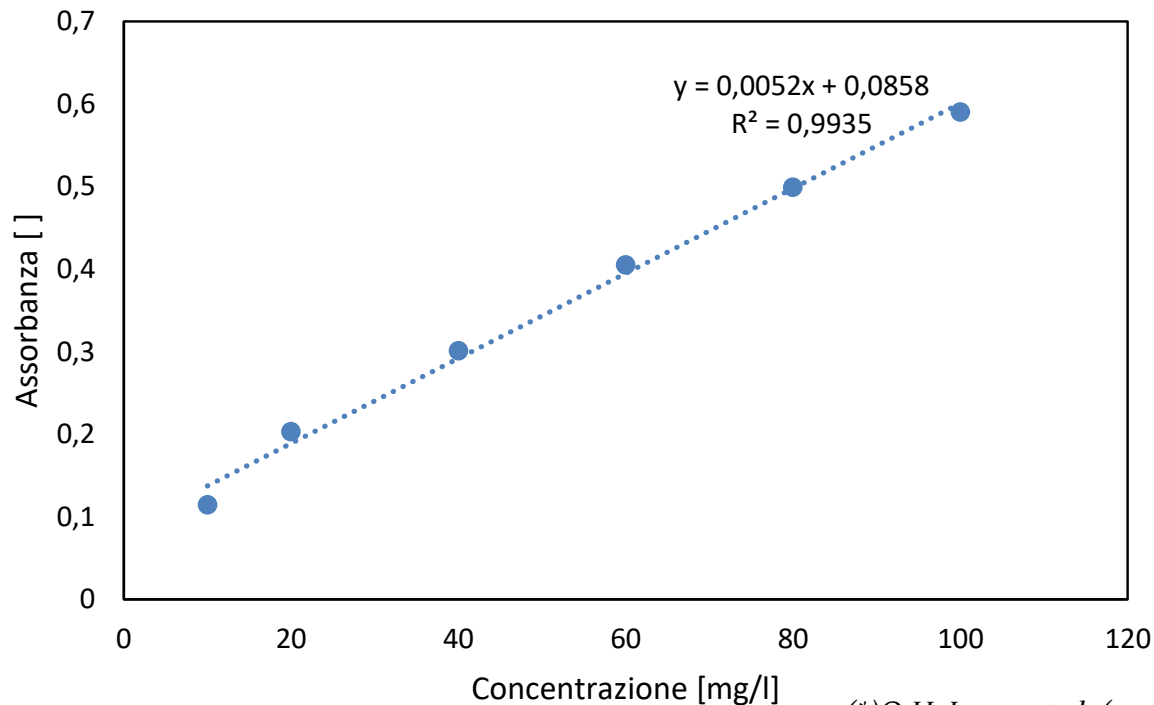
Studio interazione EPS - metallo

Analisi Colorimetriche

Misura delle proteine (Metodo Lowry)

La curva di calibrazione del metodo è stata ricavata utilizzando come standard la BSA (albumina bovina) in concentrazione 100 mg/l.

[standard]	10	20	40	60	80	100	[mg/l]
V _{H2O}	450	400	300	200	100	0	[μl]
V _{std}	50	100	200	300	400	500	[μl]



Tempo di reazione:

□ 30 minuti al buio

Lettura assorbanza:

□ 750 nm

(*)O.H. Lowry et al.,(1951) - " Protein measurement with Folin phenol reagent"

Studio interazione EPS - metallo

Analisi Colorimetriche

Misura degli acidi uronici

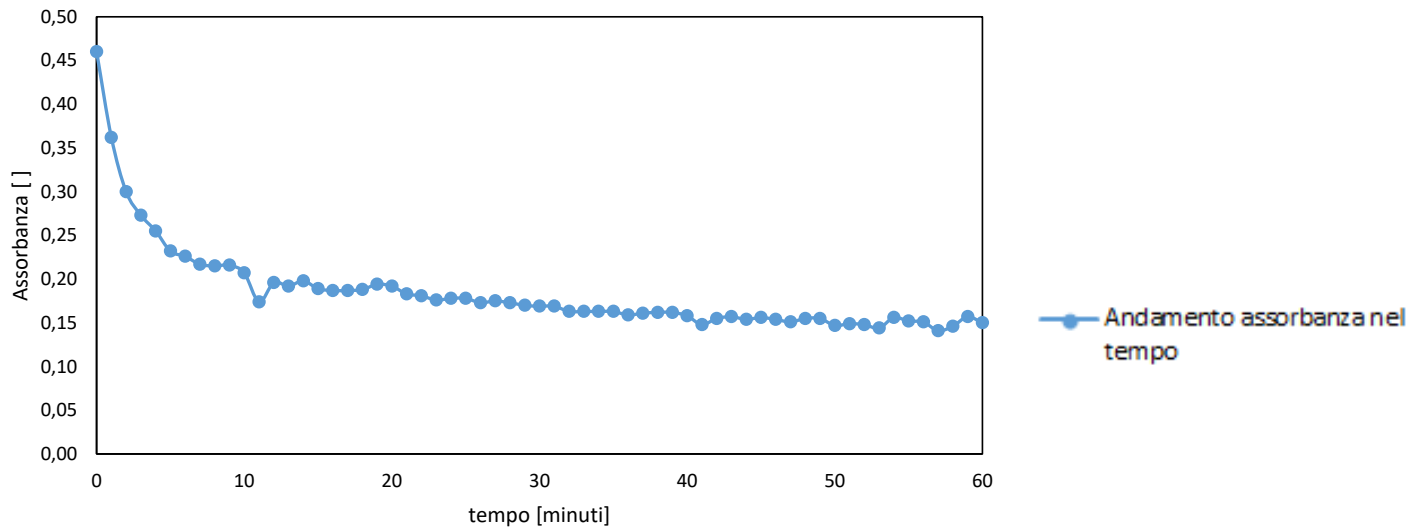
La determinazione degli acidi uronici è stata effettuata tramite il metodo del difenil fenolo.

Tempo di reazione:

☐ 40 minuti

Lettura assorbanza:

☐ 520 nm



Misura dei carboidrati

La determinazione dei carboidrati è stata effettuata attraverso il reattivo al fenolo di Dubois

Tempo di reazione:

☐ 30 min al buio

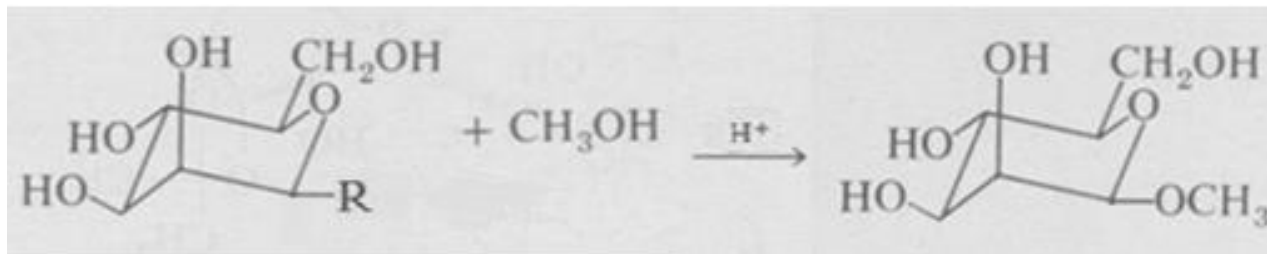
Lettura assorbanza:

☐ 492 nm

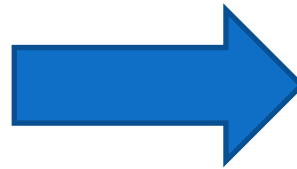
Studio interazione EPS - metallo

O-metil glicosidi peracetilati (MGA)

- ✓ Il trattamento di derivatizzazione prevede quindi una metanolisi con MeOH/HCl 1M. In questo modo vengono scissi i legami glicosidici e si ha la O-metilazione dei monosi in posizione anomerica, ottenendo quindi i metil glicosidi dei diversi zuccheri presenti nel polisaccaride



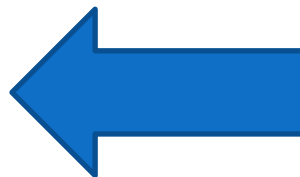
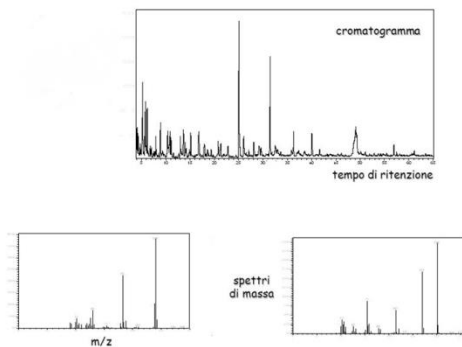
- ✓ Acetilazione con $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ e $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$



Metil glicosidi peracetilati



Esempio di cromatogramma GC-MS



Tecniche di analisi utilizzate

- Per le analisi sull'Au, la tecnica utilizzata è stata:

Spettroscopia di assorbimento atomico (AAS)



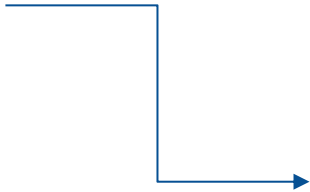
- Per le analisi sul Pd e altri metalli:



Spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS)

- Per le analisi sulle EPS:

Spettrofotometria



Gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS)



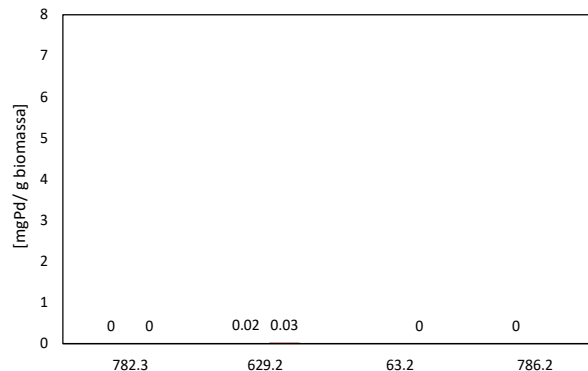
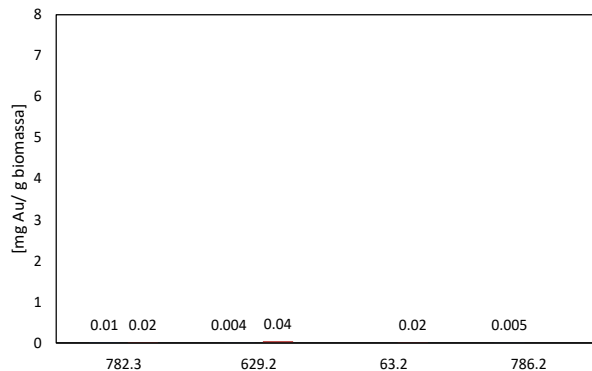
Risultati fase preliminare

Uptake di Au e Pd dei vari ceppi utilizzati

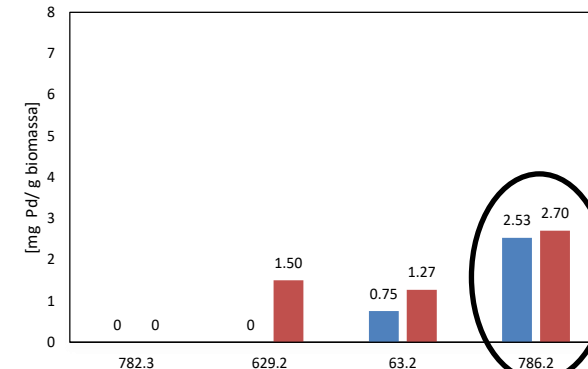
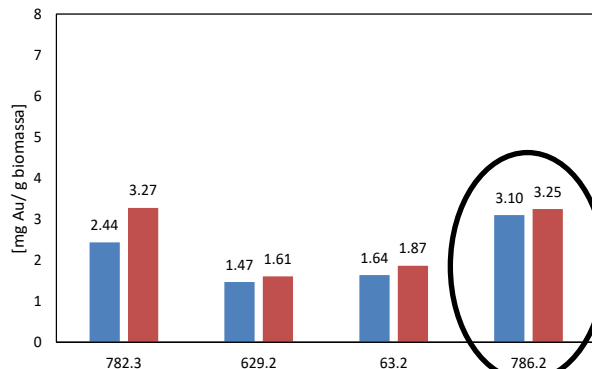
Au

Pd

1
mg/l

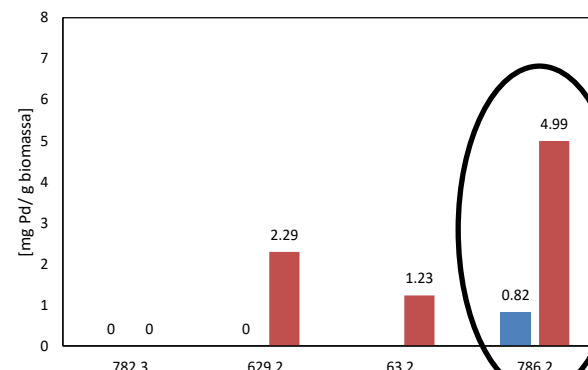
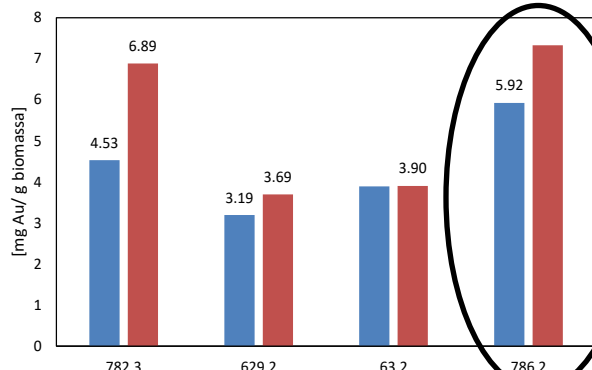


25
mg/l



Rese maggiori di uptake per il ceppo 786.2

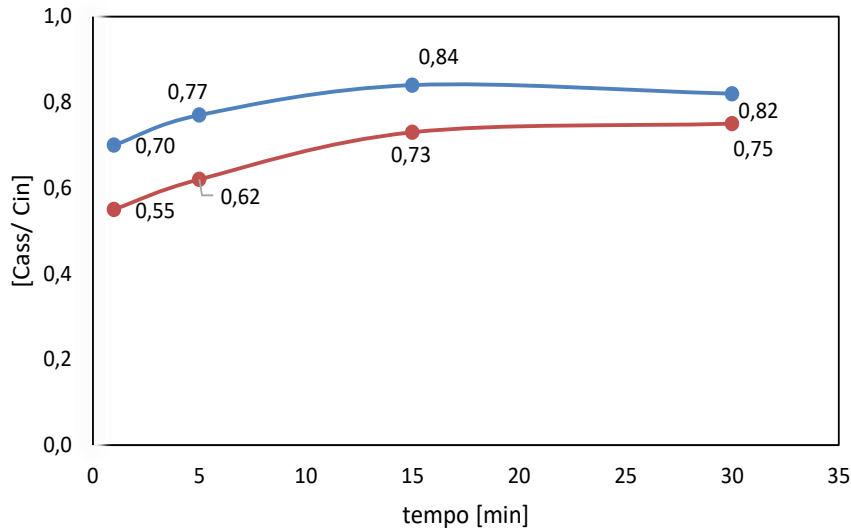
50
mg/l



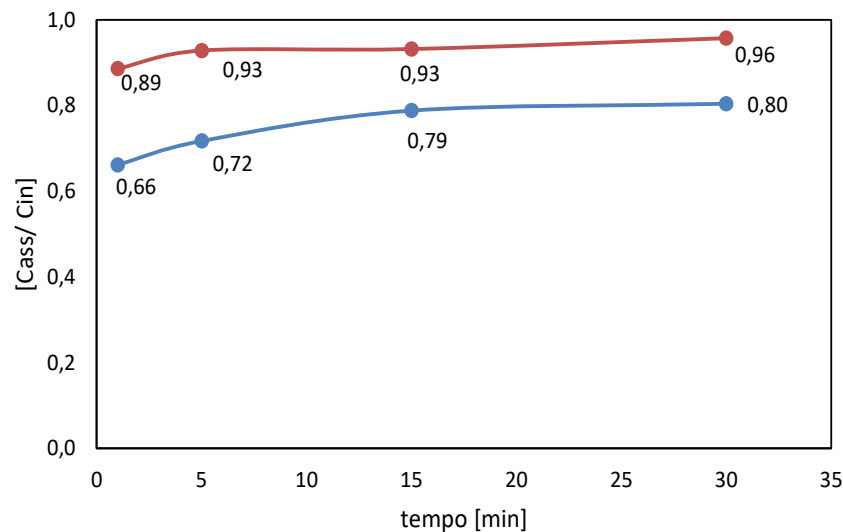
■ 30 min
■ 4d

Risultati studio 786.2

Cinetiche uptake Au e Pd



- Per l'Au biosorbimento del 70% sin dal primo minuto
- Rese più basse per il Pd
- Cinetica a doppio stadio



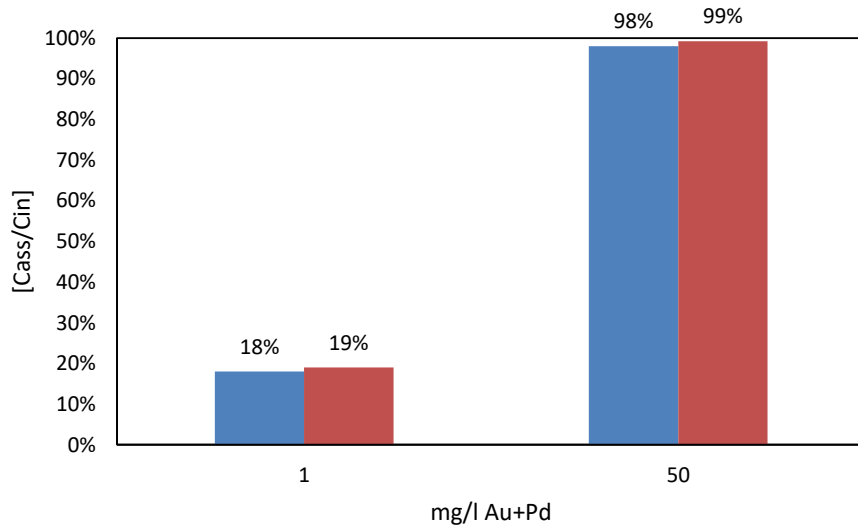
- Andamento quasi costante per il Pd
- Massimo uptake a 30 minuti

—●— Au
—●— Pd

Risultati studio 786.2

Uptake dopo contaminazione combinata Au + Pd

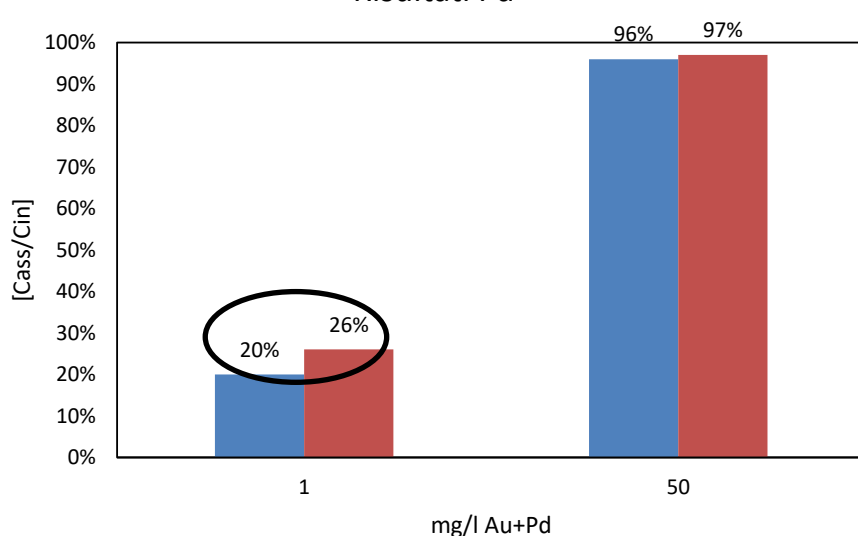
Risultati Au



✓ Risultati Au:

- la presenza del Pd non influisce sull'accumulo di Au
- maggiore assorbimento ad elevate concentrazioni

Risultati Pd



✓ Risultati Pd:

- a basse concentrazioni leggero effetto sinergico.
- percentuali di accumulo praticamente costanti tra 30 min e 1d.

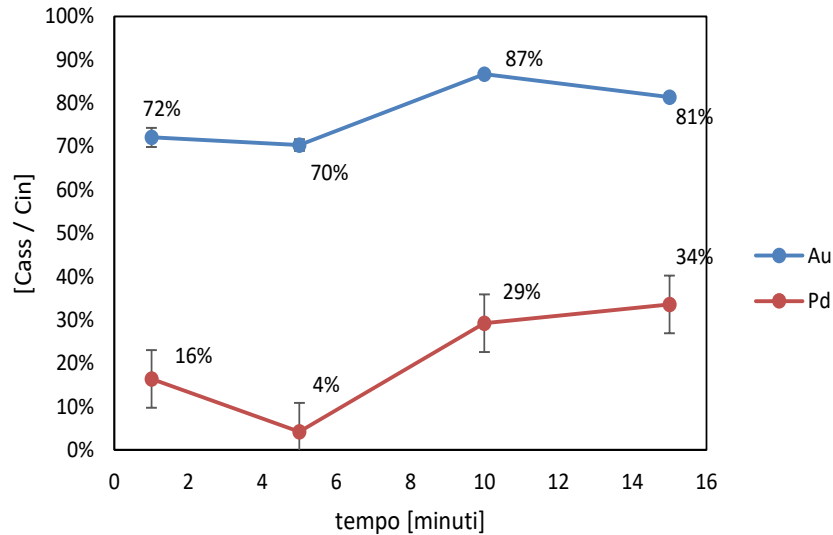
■ 30 min ALLEN

■ 1 d ALLEN

Risultati studio 786.2

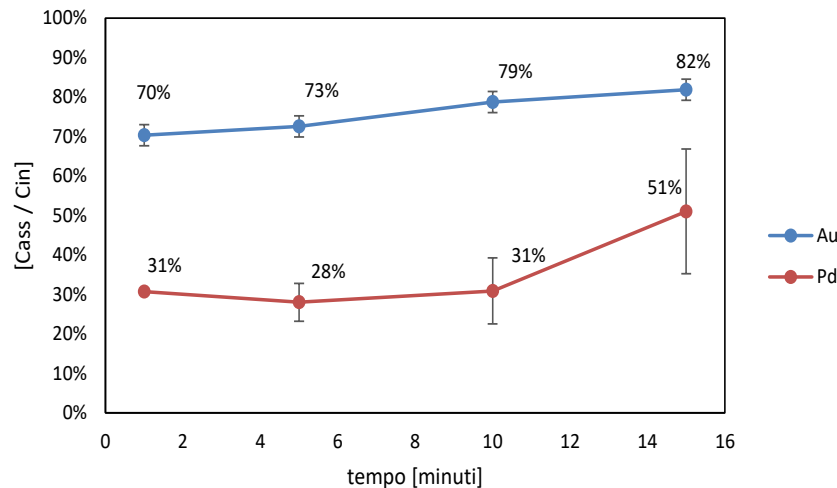
Uptake Au e Pd in refluco sintetico

Refluco sintetico



- Uptake di Au favorito in presenza di tale refluco sintetico (effetto sinergico)
- Rallentamento cinetica uptake per Pd (effetto competitivo)
- Meccanismi rapidi di assorbimento e desorbimento

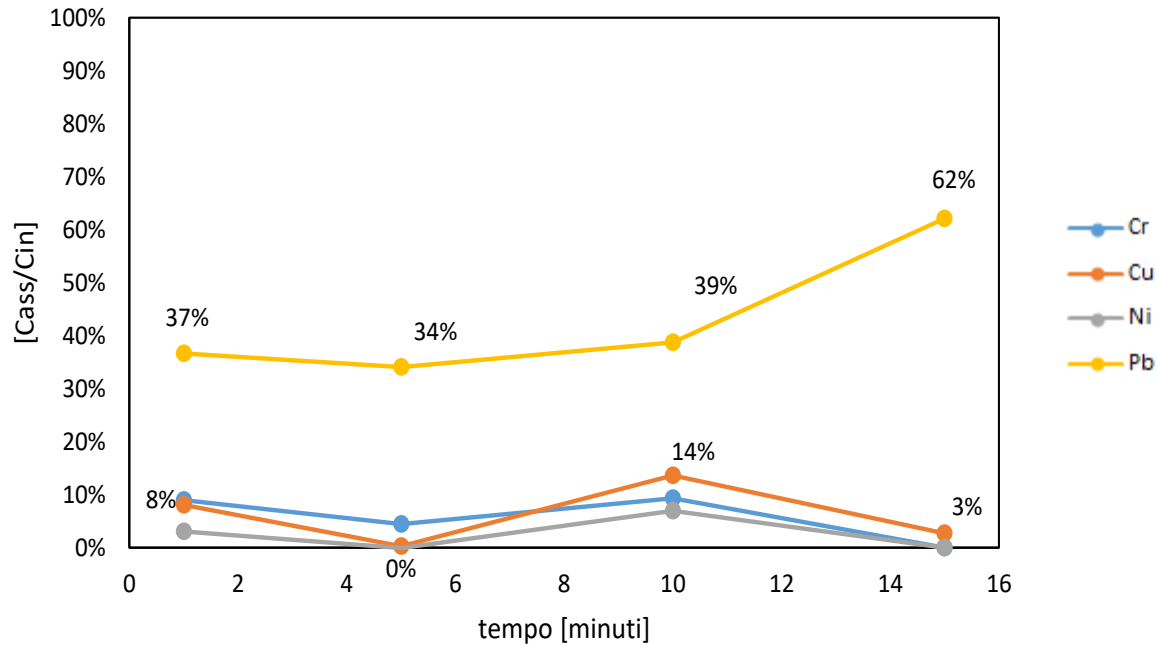
Au e Pd alle concentrazioni nel refluco



- Andamenti più regolari nel tempo in assenza di altri metalli
- Assenza di effetto competitivo per Pd, effetto sinergico per Au
- A tali rapporti reciproci il bisorbimento di Au è preponderante rispetto a quello di Pd

Risultati studio 786.2

Uptake in refluo sintetico



- Ridottissimo uptake per Ni, Cu e Cr.
- Uptake nullo per i restanti metalli.
- Eventuale meccanismo competitivo per il Pb.

Risultati meccanismo di biosorbimento e speciazione

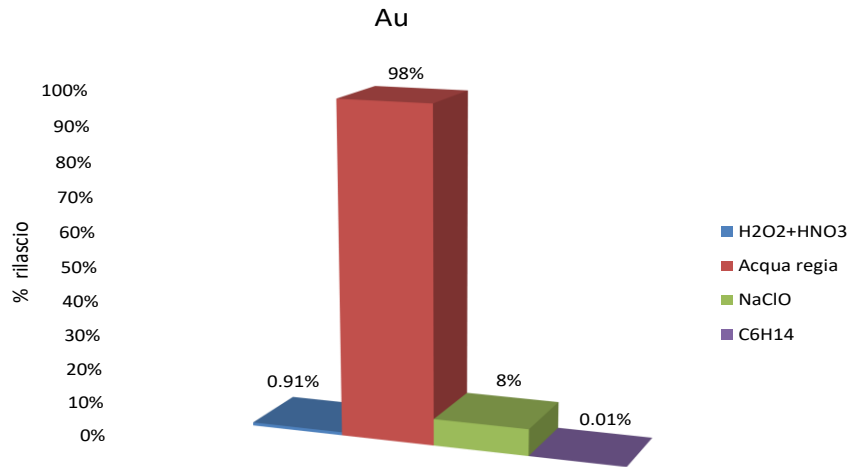
Valutazione meccanismo di biosorbimento

Contaminazione:

- 50 mg/l

Tempo:

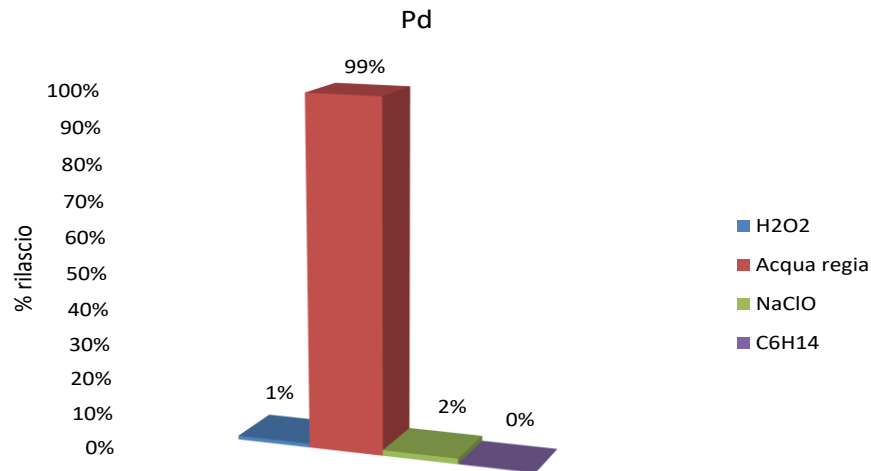
- 30 min



✓ L'alga riduce il metallo (Au e Pd) fungendo da donatrice di elettroni.

✓ Da Au³⁺ e da Pd²⁺ si arriva ad Au e Pd in forma elementare i quali precipitano.

✓ L'Au e il Pd rimangono ridotti e la S.O. viene ossidata.



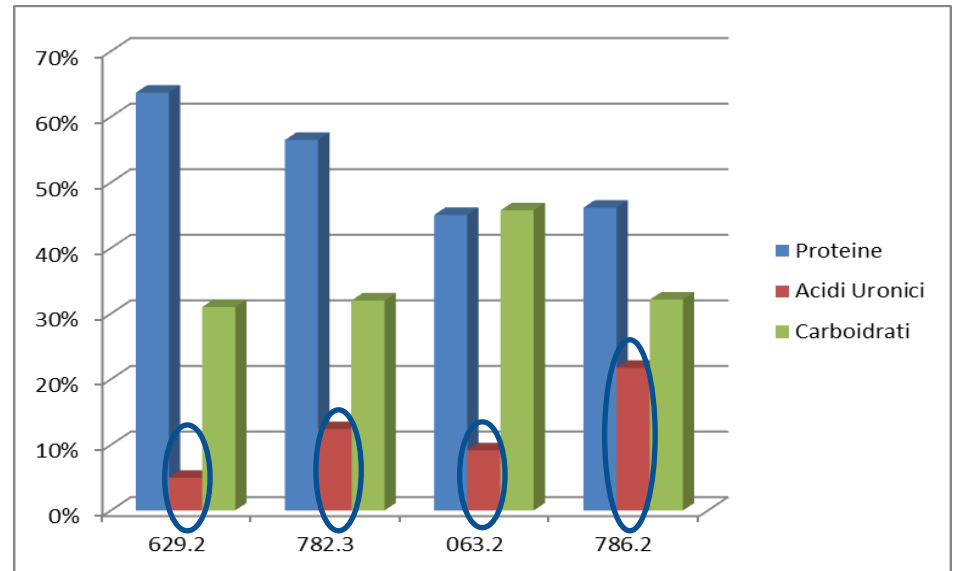
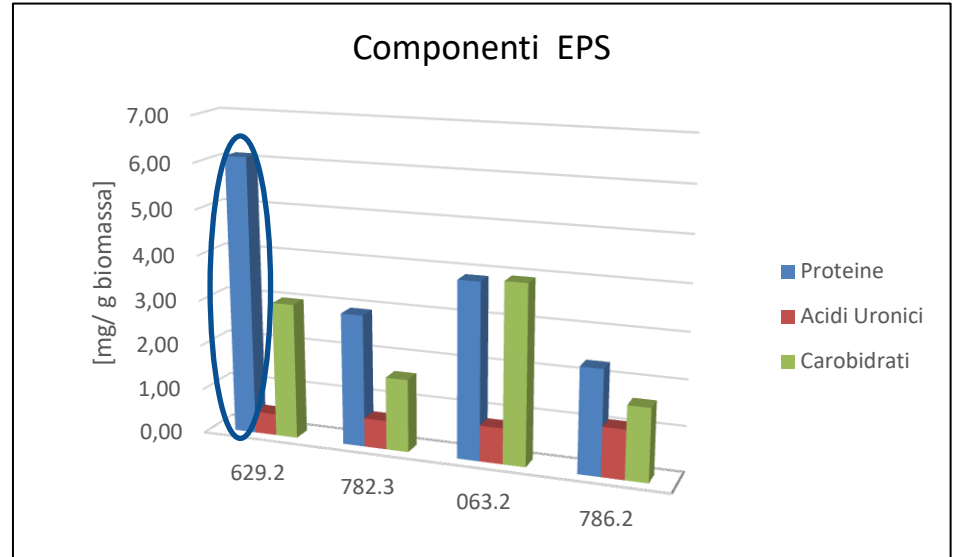
✓ Il metallo non viene rilasciato in soluzione attraverso ossidazione a mezzo di H₂O₂ e NaClO.

✓ Elevatissime efficienze di rilascio tramite acqua regia.

Risultati caratterizzazione EPS

Risultati quantitativi sulle EPS dei diversi ceppi

- ✓ Contenuto proteico maggiore per il ceppo 629.2
- ✓ Contenuto dei carboidrati nei quattro ceppi confrontabile a 2 a 2
- ✓ Maggiore presenza di acidi uronici nel ceppo 786.2

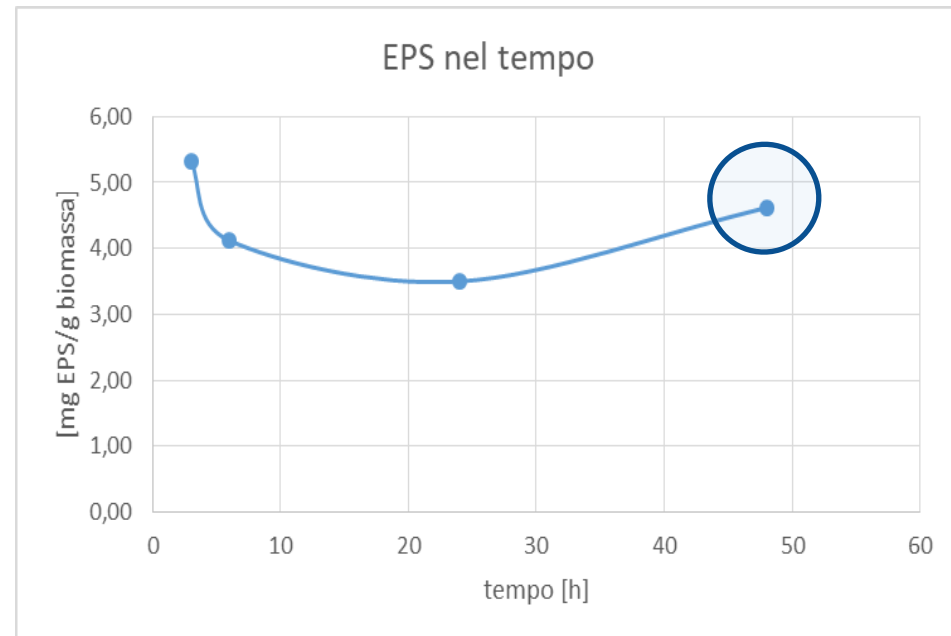


Risultati caratterizzazione EPS

EPS estratte a diversi tempi

tempo	Ceppo	conc biomassa	Proteine	Acidi Uronici	Carboidrati	Totale
(h)		(mg/l)	(mg/g biomassa)	(mg/g biomassa)	(mg/g biomassa)	(mg/g biomassa)
3	786.2	18000	2,04	1,48	1,80	5,32
6	786.2	18000	1,57	1,01	1,54	4,12
24	786.2	18000	1,32	0,98	1,2	3,50
48	786.2	18000	1,75	1,22	1,65	4,62

- ✓ Contenuto minore di EPS a 6h rispetto a 3h
- ✓ Andamento delle EPS nel tempo prima decrescente e successivamente crescente.
- ✓ Risultati che possono sembrare insoliti, ma a 48h potrebbe verificarsi una lisi cellulare.
- ✓ Ulteriori studi dovranno essere volti al monitoraggio delle EPS estratte per tempi superiori alle 48h.



Risultati interazione EPS - metallo

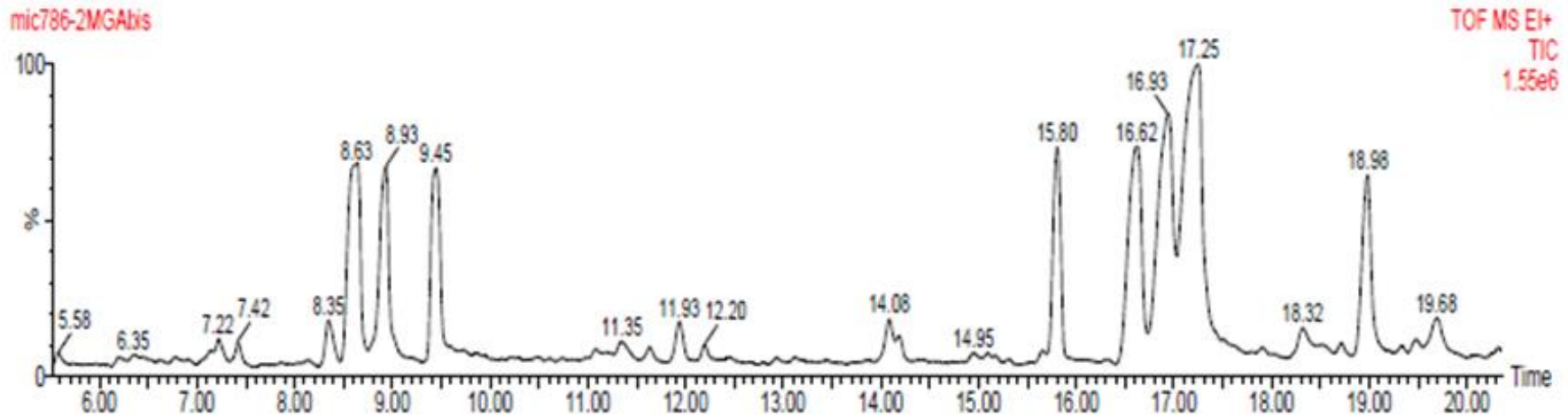
EPS estratte dopo la contaminazione

Ceppo	C _{metallo} (mg/l)	conc biomassa (mg/l)	Proteine (mg/g biomassa)	Acidi Uronici (mg/g biomassa)	Carboidrati (mg/g biomassa)	Totale (mg/g biomassa)
786.2	1 (Au)	6500	0,692	0,308	0,615	1,62
786.2	1 (Pd)	6500	0,615	0,274	0,575	1,46
786.2	50 (Au)	6500	0,385	0,191	0,325	0,90
786.2	50 (Pd)	6500	0,154	0,108	0,135	0,40

- ✓ Quantità EPS estratte minori rispetto a quelle precedenti la contaminazione
- ✓ Riduzione delle quantità estratte in base alla concentrazione di metallo presente
- ✓ Il Pd ha un'influenza maggiore sulla variazione delle EPS estratte
 - ✓ Per il Pd: riduzione di circa $\frac{1}{4}$ passando da 1mg/l a 50mg/l
 - ✓ Per l'Au: riduzione di circa $\frac{1}{2}$ passando da 1mg/l a 50mg/l

Risultati caratterizzazione EPS

Analisi componente polisaccaridica delle EPS



Sono stati rivelati i seguenti monosaccaridi:

- ✓ Ramnosio
- ✓ Arabinosio
- ✓ Xilosio
- ✓ Ribosio
- ✓ Glucosio

Acidi Uronici

***Risultato in contrasto
rispetto alle analisi
quantitative***

Conclusioni

- Ottime capacità di accumulo nei riguardi di metalli preziosi, quali Au e Pd;
- Donatrice di elettroni, riduce i metalli;
- La derivatizzazione effettuata con MeOH/HCl non ha avuto gli effetti desiderati. Alcune componenti delle EPS risultano resistenti ad attacco acido;
- Matrice EPS di difficile estrazione e caratterizzazione;
- Riduzione delle EPS estratte in seguito alla contaminazione di Au e Pd

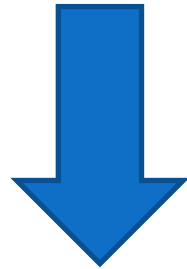
Per studi futuri

- Metanolisi in condizioni alcaline;
- Estrazione EPS a 24 h e monitoraggio dopo 48 h per avere conferma di una eventuale lisi cellulare.

Conclusioni

Ipotesi meccanismo uptake

Interazione elettrostatica sulla superficie delle EPS



Riduzione del metallo

→ Competizione

→ Sinergia

→ Esternamente?

→ Internamente?



***“L'attenzione è la forma
più rara e più pura della
generosità”***

Simone Weil

GRAZIE A TUTTI